

1957
UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DE MÉDECINE
INSTITUT D'HYGIÈNE ET DE BACTÉRIOLOGIE
DIRECTEUR: PROFESSEUR P. HAUDUROY

LES ANTIGÈNES BACTÉRIENS LYOPHILISÉS

(Brucella et Salmonella)

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE
PAR

Francine TANNER-MESSERLI

Médecin diplômé de la Confédération Suisse
Originaire de Bergen (SH) et Lausanne

LANE MEDICAL LIBRARY
SAN FRANCISCO

LAUSANNE
IMPRIMERIE C. RISOLD ET FILS
1956

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DE MÉDECINE
INSTITUT D'HYGIÈNE ET DE BACTÉRIOLOGIE
DIRECTEUR: PROFESSEUR P. HAUDUROY

LES ANTIGÈNES BACTÉRIENS LYOPHILISÉS

(Brucella et Salmonella)

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE
PAR

Francine TANNER-MESSERLI

Médecin diplômé de la Confédération Suisse
Originaire de Bergen (SH) et Lausanne

LAUSANNE
IMPRIMERIE C. RISOLD ET FILS
1956

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

FACULTÉ DE MÉDECINE

Le Conseil de la faculté de médecine de l'Université de Lausanne, après avoir pris connaissance des rapports favorables de MM. les professeurs PAUL HAUDUROY et EDOUARD JÉQUIER-DOGE et sans se prononcer sur les opinions du candidat, autorise l'impression de la thèse intitulée:

Les antigènes bactériens lyophilisés (Brucella et Salmonella)

présentée par Madame FRANCINE TANNER-MESSERLI pour l'obtention du grade de Docteur en médecine.

Lausanne, le 23 décembre 1956.

Le Doyen :
Prof. M. VULLIET

A mes parents



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153518_0187

Que Monsieur le Professeur Hauduroy veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance la plus vive pour l'amabilité constante avec laquelle il nous a prodigué ses directives et ses conseils, pour la confiance qu'il nous a témoignée en permettant l'étude de ce sujet et pour la patience qu'il a toujours montrée à notre égard.

Qu'il accepte tout spécialement notre gratitude profonde pour le soin qu'il a pris de nous faire partager l'originalité de sa position scientifique, et pour la foi avec laquelle il nous a inculqué cet esprit d'objectivité et de rigueur expérimentales dont nous avons modestement tenté de faire preuve dans ce travail.

*Qu'il nous soit permis de remercier ici très sincèrement
Le Docteur Kaplan, Vétérinaire-Chef de la Santé publique, Division
des Maladies transmissibles, auprès de l'O.M.S.*

*Le Professeur Flückiger, Directeur de l'Office Vétérinaire du Département
Fédéral de l'Economie Publique, Berne.*

*Le Docteur Bouvier, Directeur de l'Institut Vétérinaire et Labora-
toire de Recherches Galli-Valerio, à Lausanne.
qui ont bien voulu nous honorer de leurs conseils.*

*Le Professeur Blanc, Directeur de l'Institut de Mathématiques Appli-
quées de l'Ecole Polytechnique de l'Université de Lausanne
qui a pratiqué les calculs statistiques.*

*Le Professeur Vulliet, Doyen de la Faculté de Médecine de l'Univer-
sité de Lausanne,*

*Le Professeur E. Jéquier, Directeur de la Policlinique Médicale de
l'Université de Lausanne
qui ont accepté cette thèse.*

INTRODUCTION

A l'ère des découvertes bactériennes a succédé celle des perfectionnements techniques des méthodes scientifiques. La bactériologie saturée de types microbiens évolue sans cesse étendant ses applications à des domaines nouveaux, faisant l'objet d'exigences nouvelles.

A cette extension constante doit répondre l'application de techniques nouvelles.

Or, toute technique bactériologique nouvelle apporte un progrès, voire même une solution à un problème scientifique, pour autant qu'elle soit formulée assez précisément pour être reproduite exactement et aisément par d'autres chercheurs.

Inversément, nombreux sont les problèmes de pathologie infectieuse qui peuvent être éclaircis par l'apport de techniques nouvelles.

Le problème de l'uniformisation des méthodes de diagnostic de l'infection brucellique ne préoccupe pas seulement l'homme de laboratoire. Loin d'être purement spéculatif, il a des répercussions pratiques et une incidence économique importante.

Celui qui pose un diagnostic d'infection brucellique humaine en pratiquant un serodiagnostic de Widal a généralement un antigène qui, s'il n'est pas toujours d'une agglutinabilité constante, est du moins suffisant pour mettre en évidence une brucellose en évolution.

Encore constate-t-il souvent avec regret les différences sensibles d'un laboratoire à l'autre dans les réponses pour un même sérum.

L'hygiéniste qui désire enrayer l'extension de la brucellose humaine dans une certaine région n'obtiendra aucun résultat s'il ne s'attache pas à éliminer d'abord les animaux malades.

C'est ce qui permet à Lestrade de dire que « la prévention de l'infection humaine dépend essentiellement du contrôle et de l'élimination de la maladie chez l'animal ».

L'économiste aussi est sollicité par ce problème : très importantes sont les pertes économiques dues à la brucellose chez les animaux, à savoir l'avortement et la prématurité, la diminution de la lactation et la stérilité temporaire du cheptel. Si

Slink et al. estiment à 5 % le nombre du cheptel infecté aux Etats-Unis d'Amérique, Carrère et Roux portent ce chiffre à 20 % en France.

Le 31^{me} Congrès inter-américain de Brucellose (Washington nov. 1950) publie que les cas de brucellose ont diminué de moitié depuis le début de la campagne contre la brucellose animale, ce qui aurait épargné 50,000,000 de dollars par an à l'agriculture américaine.

En Norvège, la brucellose bovine a été extirpée quasi totalement. Le coût de cette campagne fut minime, en comparaison des pertes subies antérieurement (pas plus que le montant des pertes dues à la brucellose subies en une année par l'ensemble du cheptel norvégien).

Il semble donc avantageux à tous points de vue de tenter l'extirpation de la maladie chez les animaux.

La vaccination n'étant pas universellement admise, il reste la suppression des animaux infectés en se basant sur le résultat de l'épreuve d'agglutination.

A propos de cette prophylaxie vétérinaire, Janbon écrit « la séro-agglutination de Wright, qui n'entraîne qu'une seule intervention a une valeur très considérable, à condition que la technique du laboratoire soit irréprochable. Tous les rapports vétérinaires récents (Lafenêtre, Rossi, Verge) sur la prophylaxie des brucelloses animales insistent sur la nécessité de la standardisation du séro-diagnostic.»

L'Office International des Epizooties a, le premier, pris des mesures pratiques sur une grande échelle dans la voie de la standardisation de l'épreuve d'agglutination.

Sa première décision porte sur l'emploi d'un sérum agglutinant standard, lyophilisé, comme étalon international. Ce sérum, préparé par le Laboratoire de Weybridge est distribué par ce laboratoire à ceux qui en font la demande. Il n'est pas destiné à être simplement un sérum positif de contrôle, mais doit servir à titrer très précisément l'agglutinabilité d'une émulsion qui, elle, pourra être utilisée à son tour pour titrer des sérums expérimentaux positifs.

Il ne suffit pas de posséder cet étalon. Il faut encore interpréter uniformément les résultats.

« Afin d'uniformiser le diagnostic, il a été décidé de considérer comme positive toute agglutination qui se manifeste déjà à une dilution comprise entre le 1/10 et le 1/12 du titre du sérum standard en présence de l'antigène choisi pour la réaction (1948) ». Ainsi s'exprime dans son rapport à la 18^{me} session de l'Office International des Epizooties sur la Standardisation du diagnostic de la Brucellose bovine par la séro-aggluti-

nation, le Dr Willems qui estime par ailleurs que ces deux recommandations (emploi du sérum étalon et lecture uniforme) ne sont pas suffisantes pour standardiser véritablement cette épreuve. Il affirme que : « deux expérimentateurs utilisant le même sérum étalon et le même antigène, arrivent assez rarement au même résultat lorsqu'ils n'utilisent pas la même technique. A fortiori leurs diagnostics seront-ils rarement tout à fait comparables s'ils font usage d'antigènes différents.

« Je crois, continue Willams, qu'il sera difficile d'éviter, dans la pratique courante du diagnostic des écarts de $\pm 25\%$.

« C'est déjà très intéressant, mais c'est encore insuffisant lorsqu'on envisage la réaction sous l'angle de la standardisation.

« C'est pourquoi, si l'on veut réellement standardiser, — et cela paraît désirable. — tout au moins pour les animaux qui font l'objet de transactions commerciales entre Nations — il faut encore :

« a) Uniformiser l'antigène,

« b) Adopter une technique uniforme pour effectuer les dilutions.

« c) Se mettre d'accord sur la façon de lire le résultat de l'agglutination.

« En ce qui concerne le premier point, qu'il me soit permis « de reproduire ici ce que j'écrivais dans un rapport antérieur présenté récemment devant la Commission de Standardisation des produits biologiques : L'Antigène est certainement le plus difficile à uniformiser, et, cependant, c'est lui qui, du fait de sa très grande variabilité, est la cause principale des divergences que l'on signale.

« Il est bien évident que si tous les laboratoires utilisaient le même antigène, préparé, par exemple, par un Institut international, les choses seraient grandement facilitées. On conçoit aisément que des difficultés quasi insurmontables s'opposent à la mise en pratique de cette mesure. »

Si nous avons cité si longuement le Dr Willems, c'est que ces lignes posent admirablement le problème devant lequel se trouvent non seulement les vétérinaires, mais tous ceux qui doivent se soucier de la santé publique.

En 1948, un essai de stabilisation de l'antigène brucellique avait été fait dans ce but par Lerche et Roots qui ont desséché par évaporation une émulsion bactérienne obtenant une poudre que l'on remet en suspension au moment de l'emploi.

Jusqu'à présent, nous n'avons pas eu connaissance des résultats de la continuation éventuelle de ces travaux.

CHOIX DE L'ANTIGÈNE

Pour obtenir une standardisation biologique, il est primordial de tendre à ce que tous les facteurs soient aussi égaux que possible.

En ce qui concerne la standardisation du sérodiagnostic de Wright, le sérum à examiner étant le facteur variable, il semblerait normal de rendre les autres facteurs égaux : antigène, technique de dilution, interprétation du résultat.

En ce qui concerne l'antigène, on a proposé à maintes reprises l'usage d'une souche unique, cultivée avec une technique identique sur un milieu identique.

Les souches les plus fréquemment proposées sont :

La souche N° 99 du Laboratoire de Weybridge (Angleterre) ;

La souche N° 1119-3 du Bureau of Animal Industries à Beltsville (U.S.A.) ;

La souche du Centre de Recherches de la Fièvre ondulante à Montpellier (France).

Les milieux et les temps de culture varient avec les souches proposées.

Si les partisans d'une souche unique tiennent chacun à la leur, les adversaires du principe préfèrent des souches locales, isolées dans le pays et plus à même, selon eux, de détecter l'infection dans la forme où elle se présente localement.

D'autres arguments sont élevés contre la souche unique. Renoux à Tunis a observé des erreurs de diagnostic dans la brucellose des caprins avec l'emploi de certaines souches.

Il est donc illusoire de penser arriver à un accord sur ce point.

Les techniques de dilution varient aussi (taux de dilution 1/20, 1/40, 1/80, etc. ou dilution préalable du sérum 1/160, 1/240 etc.). Certains chercheurs indiquent comme taux le dernier tube dont le liquide surnageant est tout à fait clair, d'autres le dernier où il y a encore une agglutination même minime. D'autres enfin, recherchent l'agglutination à 50 %. Ce procédé, plus fin, permet une lecture aisée : On note le tube dans lequel il y a encore une agglutination et dont l'opacité du liquide surnageant correspond à celle de l'antigène employé dilué de moitié par de l'eau physiologique.

Cette méthode de lecture doit être employée pour la titra-

tion d'un antigène à l'aide du sérum standard de l'Office International des Epizooties.

Si l'on peut déplorer la diversité des souches et des techniques, on ne peut pas espérer l'abolir totalement. Une technique qui stabiliserait définitivement les antigènes permettant de les comparer entre eux, donnerait la possibilité à chaque groupe de travailleurs de garder sa souche et ses méthodes tout en sachant à quoi elles correspondent vis-à-vis de l'étalon international.

La lyophilisation (ou freeze drying) permettant, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, de fixer les germes dans leur état actuel avec toutes leurs propriétés, les propriétés antigéniques entre autre, nous a paru une des possibilités de stabilisation des antigènes bactériens. C'est donc dans ce but que nous avons tenté la lyophilisation de l'antigène brucellique.

En lyophilisant de l'antigène brucellique, nous n'avons pas préféré une souche ni une méthode à une autre. Nous avons, au contraire, essayé de montrer que cette technique de lyophilisation de l'antigène brucellique s'appliquait à toutes les émulsions ayant une agglutinabilité spécifique satisfaisante.

Le travailleur qui fabriquerait un assez gros lot d'antigène, qui le lyophiliserait d'une manière adéquate et en titrerait un échantillon vis-à-vis du sérum étalon, pourrait théoriquement travailler toute sa vie avec son antigène toujours pareil à lui-même. Il serait à même de comparer chaque résultat avec les précédents et avec ceux d'autres laboratoires, s'étant aussi référé à l'étalon international pour leur titration.

L'Organisation mondiale de la Santé, par la voix du Comité mixte FAO/OMS d'Experts de la brucellose a formulé les mêmes vœux : « Le Comité a souligné à nouveau combien il importait qu'en publiant des résultats fondés sur des épreuves de séro-agglutination, les chercheurs indiquent la sensibilité de la méthode employée, car l'indication de la dilution à laquelle on obtient une agglutination de 50 %, lorsqu'on procède à l'épreuve sur l'étalon international de sérum **anti-Brucella abortus**, avec un antigène et par une méthode donnée, permet aux chercheurs des autres pays de connaître immédiatement la sensibilité de la méthode employée, et, par suite, la signification réelle de tout titre diagnostiqué ou mentionné. »

LA LYOPHILISATION

Le problème de la standardisation de l'antigène brucellique une fois posé, ses difficultés connues, les avantages qu'elle présenterait discutées, on comprendra facilement que nous nous soyons tournés vers la lyophilisation pour essayer de résoudre le problème.

Ceci étant d'autant plus naturel que le Professeur Hauduroy a mis au point à l'Institut d'Hygiène de Lausanne le prototype d'un appareil à lyophiliser. Intéressé depuis fort longtemps par le problème de la stabilisation des caractères des souches microbiennes en cultures pures, ainsi que celle d'autres produits biologiques, il a publié en 1938 déjà ses résultats sur la lyophilisation de 28 souches de streptocoques.

Je ne reprendrai pas l'historique des modes de conservation des bactéries par d'autres méthodes que la lyophilisation.

Très tôt, les bactériologues ont observé que les bactéries résistent mieux au froid qu'à la chaleur. Pasteur déjà, en 1851, constate que certains germes résistent à une température de — 30°.

Becquerel, en 1931, pense que le froid associé à la dessiccation et au vide, constitue le conditionnement permettant d'amener des cultures à l'état de « vie suspendue ».

Les basses températures appliquées brutalement ne modifient que peu ou pas les caractères des germes, surtout si les bactéries sont protégées par des protéines ou des sucres.

L'action de dessiccation obtenue par les moyens les plus divers varie avec une multitude de facteurs : Espèce microbienne, nature et nombre des germes vivants, nature du protecteur, température de dessiccation, rapidité de l'opération.

La lyophilisation est une méthode apparue relativement tard et qui n'a pas été employée d'abord pour conserver des cultures bactériennes, mais pour stabiliser d'autres produits biologiques non vivants.

C'est Shackell aux États-Unis qui apporte les éléments d'une technique nouvelle et qui, le premier, utilise la sublimation pour la dessiccation. La sublimation est l'opération qui consiste à faire passer un élément de l'état solide à l'état gazeux, ou inversement, sans passer par l'état liquide. L'évaporation à basse température, sous le vide, produisant une congélation du pro-

duit qui s'évapore et nous mettant en présence d'une sublimation de la glace, est déjà citée par Wollaston en 1813, à titre de curiosité.

Les travaux de Shackell portent sur des liquides organiques tels que sérum de cobaye, virus, etc., tandis que les travaux de Wollaston ne concernaient pas des produits biologiques.

Après plusieurs modifications de techniques, Shackell formule sa méthode qui consiste à congeler préalablement le liquide à dessécher, à le soumettre ensuite au vide, au moyen d'une pompe donnant rapidement un vide de quelques fractions de mm. Hg. Il aide l'absorption des vapeurs d'eau par l'introduction d'acide sulfurique fréquemment agité dans le fond de l'exsiccateur. Il insiste déjà sur la nécessité d'une dessiccation rapide pour éviter toute modification biologique et obtenir des produits facilement remis en suspension.

Des travaux très nombreux avec des modifications plus ou moins heureuses, sont venus confirmer les premiers travaux de Shackell et ont permis une application plus large de sa méthode à la conservation des bactéries sous forme lyophilisée, tels ceux de Rogers dans l'industrie laitière, puis de Bussan, Alramson, Rous, Murphy et enfin Swift et bien d'autres.

Otten précise les points techniques importants au cours de la lyophilisation : la suspension doit être riche en germes, et il doit y avoir un protecteur, par exemple les protéines que contient le milieu de suspension. De plus, il ajoute à la technique de sublimation un point très important à notre avis : c'est le premier qui cherche à maintenir les produits sous le vide durant toute la durée de l'opération.

En 1932, Pauli reprend la méthode d'Otten et dessèche des suspensions de bactéries en sérum, des virus et même des protozoaires qu'il réussit à conserver vivants plus d'un an et demi.

Flosdorf, en 1933, étudie la méthode de dessiccation par sublimation pour perfectionner la stockage de son sérum sec. Il dessèche le sérum directement dans les ampoules définitives destinées à l'emploi. Avec Mudd, il donne le résultat de leurs travaux sur la conservation sous la forme lyophile de sérum, de solutions de protéine, de cultures de bactéries, et d'autres produits biologiques.

Le principe de leur méthode consiste en une congélation préalable rapide à basse température, suivie d'une déshydratation rapide aussi, du produit qu'ils traitent. La substance obtenue par ce procédé est un solide poreux, dont le volume est identique au volume du liquide initial, et qui se re-dissout ou bien se remet en suspension instantanément dans l'eau distillée.

Les différents appareils qu'ils décrivent ont tous une pièce centrale (rampe ou récipient cylindrique) munie de plusieurs embouchures où l'on fixe les ampoules, deux condensateurs, primaire et secondaire, plongés dans un mélange réfrigérant. Le condensateur secondaire relie le circuit à une pompe à vide donnant une pression de l'ordre du millième de mm. Hg. Comme manomètre ils utilisent la jauge de MacLeod.

Les appareils décrits vont du petit appareil de laboratoire pour six ampoules à l'installation industrielle permettant de dessécher plus de 200 ampoules simultanément.

Wooley conserve du virus d'encéphalite pendant 3 ans environ après lyophilisation par le procédé de Florsdorf.

Par la suite, de nombreux auteurs ont publié les résultats de leurs essais de conservation de différents produits biologiques, de cultures bactériennes en particulier, par lyophilisation.

La valeur de leurs résultats varie beaucoup : la proportion des germes restant vivants après l'opération — par rapport au nombre initial de germes vivants —, le temps de conservation après la lyophilisation, sont plus ou moins satisfaisants suivant les différentes techniques employées.

Les points importants de l'opération nous semblent être

- 1) la rapidité de la congélation initiale, qui doit être brutale,
- 2) la forme du solide obtenu par cette congélation, qui doit être en couche mince,
- 3) le temps employé pour arriver à un vide de 10^{-3} mm. Hg. qui doit être aussi réduit que possible,
- 4) l'adjonction du protecteur, qui doit être bien choisi. Lorsqu'il s'agit de substances vivantes, ou même de certaines bactéries mortes, dont on veut conserver intacts certains caractères biologiques cruciaux, le protecteur est indispensable. Une protéine, du sérum en particulier, nous a donné les meilleurs résultats.

On doit tenir compte de ces points pour la construction d'un appareil à lyophiliser.

Si le principe en est simple, on se heurte dans son application pratique à quantité de petits détails techniques, qui rendent délicate la construction d'un appareil à lyophiliser.

Après quelques essais avec des appareils plus petits qui les ont rompus à la pratique de la lyophilisation des cultures bactériennes, Hauduroy et ses collaborateurs ont mis au point à l'Institut d'Hygiène de Lausanne un appareil à lyophiliser qui est utilisé dans ce laboratoire sur une assez grande échelle pour la dessiccation de cultures microbiennes, de vaccins BCG, de sérum

de cobaye. enfin d'antigènes bactériens, ce qui fait l'objet de ce travail.

Description de l'appareil.

Cette machine se présente sous la forme d'une grande « araignée » ayant un corps central circulaire et huit rampes radiales.

La partie centrale est constituée par une pièce métallique de laquelle partent les rampes latérales. Chacune de ces rampes est munie d'un robinet-bloc métallique, parfaitement étanche, qui permet d'isoler la rampe du reste de l'appareil, en y maintenant longtemps un vide poussé ou en l'interrompant à volonté. Chaque rampe est pourvue de vingt-cinq tétines, composées chacune d'un tube métallique saillant et d'un caoutchouc étanches au vide. On branche sur chacune d'elles une ampoule par l'intermédiaire du tube de caoutchouc.

La pièce métallique centrale recèle une pompe à diffusion à vapeur de mercure, possédant une grande vitesse d'aspiration.

Sur cette pièce centrale est monté le condenseur : c'est un ballon de verre qui est plongé dans un mélange réfrigérant. Ce mélange, neige carbonique concassée et acétone est contenu dans un vase de Dewar, ou dans un simple thermos de diamètre légèrement plus gros que le ballon. Ce condenseur est placé entre la pompe à diffusion et la pompe à palette, dont nous reparlerons.

Il joue deux rôles : tout d'abord celui de « point froid » de l'appareil. Le mélange étant à -70° , cela crée entre le condenseur et le matériel à lyophiliser contenu dans les ampoules, qui, coagulé brutalement, se réchauffe progressivement à -10° environ, une chute de tension de vapeur qui est assez importante pour que la sublimation s'effectue normalement.

Son deuxième rôle est celui de piège des vapeurs d'eau qui sortent de la pompe à diffusion et viennent se condenser dans le ballon. Il est en effet essentiel que ces vapeurs ne continuent pas le circuit : leur passage dans la pompe à palette et leur mélange à l'huile qu'elle contient compromettraient son fonctionnement.

L'ensemble est à deux étages de pompes. La pompe à palette constitue la pompe primaire, l'amorce préalable au fonctionnement de la pompe à diffusion à vapeur de mercure.

Enfin, les accessoires indispensables à cet appareil sont d'une part les indicateurs du vide : jauge de MacLeod ou manomètre, ou les deux à la fois, placés sur le circuit, l'un avant, l'autre après le condenseur. D'autre part, il est utile de posséder un

appareil à haute fréquence qui permet de contrôler le vide dans chaque ampoule

Fonctionnement de l'appareil.

Le condenseur est muni de mélange réfrigérant.

On fait entrer en action la pompe à palette pour faire le vide dans le corps de l'appareil, tous les robinets-bloc des rampes étant fermés. Les rampes ne sont donc pas sous le vide.

On fixe les ampoules chacune sur une tétine.

On congèle les 25 ampoules d'une rampe en amenant à leur contact un petit récipient contenant le même mélange réfrigérant que celui du condenseur. Si l'on dispose d'ampoules à fond plat, dans lesquelles le liquide peut s'étaler largement, ou s'il y a très peu de matériel dans les ampoules, il est aisé de coaguler plusieurs ampoules à la fois, car il n'est pas nécessaire de leur imprimer un mouvement de rotation. Au contraire, si le matériel à lyophiliser se trouve dans les ampoules en couche épaisse, il est nécessaire en les congelant de les faire tourner pour obtenir une diffusion le long des parois, ce qui amincira le solide ainsi constitué.

Une fois toutes les ampoules congelées, on ouvre le robinet-bloc correspondant. Il se produit alors une chute sensible du vide, qui se rétablit progressivement dans les minutes qui suivent. On ouvre alors le robinet de la deuxième rampe, s'il y a lieu, et ainsi de suite. La pompe à diffusion de vapeurs de mercure se met en marche lorsque le vide a atteint 10^{-1} mm. Hg.

Lorsque le produit est sec, on scelle les ampoules sous le vide, rampe après rampe.

En utilisant cet appareil, il n'est pas nécessaire, comme c'est le cas pour d'autres, de réchauffer les ampoules au cours de l'opération, il est indispensable, par contre, que la température de la pièce dans laquelle on travaille soit suffisante (environ 20° C.).

Cet appareil permet de lyophiliser 200 ampoules en travail continu, rapidement. Chaque ampoule est atteignable en tout temps. On peut ainsi contrôler le vide à l'aide de l'appareil à haute fréquence et déceler facilement les ampoules fendues ou poreuses.

Il est facilement adaptable à la lyophilisation de produits très dissemblables, tant dans leur nature que dans leur quantité. On peut par exemple brancher sur cet appareil aussi bien de petites ampoules à col déjà étiré prêt au scellage, des ampoules plus grosses, à fond plat par exemple, ou même des ballons ou des Erlenmeyer. On peut lyophiliser sans avoir à

adapter l'appareil aussi bien une goutte d'émulsion bactérienne qu'un litre de sérum par exemple.

Le principe général de la lyophilisation étant posé, l'appareil dont nous nous sommes servis étant décrit, nous exposerons plus facilement la technique de la lyophilisation de l'antigène brucellique, dont le détail des manœuvres sera exposé à la fin du chapitre III.

TECHNIQUE DE FABRICATION DE L'ANTIGÈNE

Nous avons adopté la technique de fabrication de l'antigène brucellique qui est recommandée par l'O.M.S. (groupe OMS/OAA d'Experts de la Brucellose) WHO/Bruc/21-23 octobre 1950): Concentré et suspension standardisée de *Brucella abortus* en vue de l'épreuve d'Agglutination (Ministère de l'Agriculture et des Pêcheries, Laboratoire vétérinaire, Weybridge).

Nous redonnons ici le détail de la technique telle que nous l'avons appliquée à l'Institut d'Hygiène de Lausanne :

La souche employée est la souche N° 99 du Laboratoire de Weybridge. Elle est déposée au Centre de Collections de types microbiens de la Faculté de Médecine de Lausanne ; elle y porte de N° 486. Pour sa conservation, elle est mise en suspension dans du sérum de lapin et lyophilisée sous le vide.

Le milieu sur lequel on cultive cette souche est la gélose-sérum : à 5 % glucosée à 1 %. Pratiquement, nous ajoutons à 100 cc. de sérum de cheval inactivé 40 cc. d'une solution de glucose à 50 %. Nous filtrons le tout sur filtre Seitz stérilisant. Nous ajoutons 7 cc. de ce mélange à 100 cc. de gélose ordinaire à 2,5 %.

Les gestes bactériologiques sont les suivants :

1) Reconstituer une culture lyophilisée en ajoutant quelques gouttes de bouillon ordinaire et ensemencer sur des tubes de gélose-sérum glucose. Mettre à l'étuve 72 heures à 37°. Emulsionner la culture dans de l'eau physiologique à 0,85 % et en semencer des boîtes de Roux.

2) Préparation des boîtes de Roux : Mettre dans de grandes boîtes de Roux 100 cc. de gélose ordinaire à 2,5 %. Stériliser. Laisser refroidir à 52° env. Ajouter 7 cc. du mélange sérum-glucose en mélangeant par mouvements de bascule. Laisser à plat, gélose en bas, pendant 24 heures. Puis, éprouver 24 heures à l'étuve à plat, gélose en haut. Eliminer les boîtes contaminées.

3) Ensemencer avec l'émulsion 1. Les boîtes de Roux et laisser également 72 heures à l'étuve, en position horizontale, la gélose se trouvant à la partie supérieure.

4. Récolte de l'antigène : On vérifie soigneusement chaque boîte à la loupe. On élimine celles qui contiennent

des colonies d'autres germes,
des colonies R. (rugueuses).

A part l'aspect lisse de leur surface, il nous semble que les colonies S (smooth) ont une transparence propre qui permet de les reconnaître aisément.

5) On avait préparé préalablement des tubes contenant environ 20 cc. d'eau physiologique stérile, et des perles de verre. On verse le contenu d'un tube dans chaque boîte de Roux sélectionnée. On récolte aisément les corps bactériens par entraînement.

6) Cette émulsion est filtrée sur laine de verre pour éliminer les particules de gélose.

7) On tue ensuite les germes en portant l'émulsion à 60° pendant une heure. On laisse refroidir.

8) On filtre sur tampon de coton.

9) On ajoute de l'acide phénique de façon à obtenir une concentration finale de 5/1000. (5 pour mille).

10. On place cette émulsion à la glacière pendant au moins une semaine.

Titration de l'antigène.

1) Bien mélanger la suspension concentrée et diluer 1 cc. dans une solution physiologique phéniquée jusqu'à ce qu'elle corresponde au tube N° 4 des tubes d'opacité de Brown. (Tubes de Brown : le tube 4 équivaut approximativement à 6.500.000.000 de micro-organismes de *Brucella abortus* par cc. ou équivaut à l'opacité produite en mélangeant 4 cc. de chlorure de baryum à 1 % et 96 cc. d'acide sulfurique dilué.) Poursuivre les dilutions de la suspension : par exemple, si la première dilution était de 1/20 il y aurait lieu de diluer à 1/22, 1/24, 1/36, 1/38.

2) Prendre une ampoule et reconstituer le sérum étalon lyophilisé en ajoutant 1 cc. d'eau distillée stérile. Faire des dilutions dans une solution physiologique phéniquée, à savoir au 1/160, 1/200, 1/240, 1/280, 1/320.

3) Mettre dans cinq séries de tubes appropriés (c.à d. 1 série pour chaque dilution de la suspension concentrée) 0,5 cc. de chacune des dilutions de sérum, puis 0,5 cc. d'une dilution de suspension concentrée, en mélangeant bien. Cette opération permettra de doubler les dilutions de sérum, c. à d. d'obtenir des dilutions au 1/320, 1/400, 1/480, 1/560, 1/640. Mettre à l'étuve pendant environ 20 heures à 37° et examiner sur fond sombre. La dilution de la suspension qui doit être choisie est celle qui

accuse 2 plus (+ +) ou une agglutination de 50 % à la dilution finale au 1/480 du sérum lyophilisé.

Par exemple, si une dilution de 1/22 du concentré initial accuse une agglutination (+) à une dilution finale au 1/480 de la suspension de sérum et une dilution de 1/24 donne ++ au 1/480 avec + au 1/560, c'est une dilution de 1/24 du concentré initial qu'il faut prélever.

C'est elle qui constitue la suspension standardisée de *Brucella abortus* en vue de l'épreuve d'agglutination.

3) En lyophilisant l'antigène, c'est de ce résultat final dont on doit tenir compte pour le calcul de la quantité à distribuer dans chaque ampoule. Dans l'exemple ci-dessus, chaque c.c. de l'émulsion concentrée doit être dilué à 24 cc. pour obtenir l'émulsion prête à l'usage. En lyophilisant 1 cc. par ampoule, on indiquerait « pour 24 cc. d'antigène prêts à l'emploi ». En pratique, on distribue une quantité suffisante pour 50 cc. d'antigène prêts à l'emploi.

Lyophilisation de l'antigène.

On centrifuge l'émulsion concentrée et titrée à 5-7000 tours, minute pendant 20 minutes environ, de façon à obtenir un liquide surnageant clair. Les culots bactériens sont repris avec une petite quantité de sérum de lapin décomplémenté stérile non-hémolysé dont on s'est assuré qu'il ne contenait aucune agglutinine anti-brucellique. Nous avons essayé les protecteurs suivants : sérum de bœuf, de cheval, de cobaye, lait de vache, lait de femme, glucose, lactose, tous ne contenant aucune agglutinine anti-brucellique. Aucun de ces produits ne nous a permis une aussi bonne mise en suspension de l'antigène lyophilisé que celle que nous avons obtenue avec du sérum de lapin.

Le mélange culot bactérien-sérum bien homogénéisé est distribué en ampoules en quantités déterminées. On se rapporte pour le calcul de ces quantités au chiffre obtenu en titrant l'antigène et on s'arrange de façon à obtenir des ampoules qui contiendront finalement du matériel pour reconstituer 50 cc. d'antigène prêt à l'emploi. La quantité de sérum n'a en elle-même aucune importance. Elle dépend du calcul de la quantité d'antigène : on s'arrange à avoir un mélange qui soit distribué facilement, par exemple 0,1 cc. ou 0,2 cc.

Les ampoules utilisées sont celles qui ont été préconisées par Hauduroy (Ann. Biol. Clin. 1951, 9. 100). Elles sont larges, ont un fond plat, et un col excentrique. Elles permettent une lyophilisation rapide grâce à l'étalement du produit. Le col est

excentrique pour éviter la perte de matériel sec. La distribution dans les ampoules se fait au moyen de seringues à tuberculine, sur lesquelles ont monte de longues aiguilles hypodermiques de gros calibre, sans biseau, de façon à pouvoir déposer les gouttes au fond de l'ampoule, sans perte de matériel. Il ne faut pas non plus que le matériel touche le col de l'ampoule : le produit étant très concentré, cette perte serait sensible dans la titration ultérieure de l'antigène lyophilisé. De plus, les ampoules ayant eu des cols souillés par des produits albumineux sont plus facilement perméables à l'air une fois scellés.

La technique de la lyophilisation est celle dont nous avons parlé au chapitre II. On pourrait penser, puisqu'il s'agit de germes morts, que la technique de lyophilisation importe peu. Bien au contraire, pour obtenir un produit homogène qui se remette facilement en suspension, et ne risque pas de s'auto-agglutiner, il est indispensable de lyophiliser avec une technique extrêmement rigoureuse. De toutes façons, les dessications sans congélation préalable ont été écartées d'emblée. Mais nous avons essayé d'utiliser d'autres techniques de lyophilisation plus lentes. Les résultats n'ont pas été satisfaisants. Nous en sommes arrivés à la conclusion qu'il est indispensable de congeler brusquement le produit à moins 70°, et de lyophiliser rapidement en obtenant un vide égal à 10^{-3} mm. Hg. Avec l'appareil que nous avons utilisé, la lyophilisation est terminée en moins d'une heure pour ce qui concerne une rampe d'ampoules habituelles (25 ampoules), contenant du matériel permettant de préparer 50 cc. d'antigène. Les ampoules sont scellées sous vide. Nous avons préparé à plusieurs reprises un certain nombre d'ampoules que nous n'avons pas scellées sous vide, afin de voir si l'on pouvait supprimer cette opération assez longue et qui demande des ampoules d'une qualité irréprochable. Les ampoules qui contenaient de l'air ont été conservées en même temps que des ampoules-témoin, scellées sous vide. Au bout de trois mois environ, le contenu des ampoules contenant de l'air n'a pu être mis aussi facilement en suspension que celui des ampoules scellées sous vide. Au bout de six mois, le contenu des premières était inutilisable. Ainsi, nous n'avons pas pu supprimer cette opération et continuons à sceller les ampoules sous vide.

Contrôle de l'antigène.

Après la lyophilisation, on procède à une nouvelle standardisation de l'antigène en le titrant avec le sérum-standard qui a été utilisé pour titrer l'antigène avant la lyophilisation.

Pour ce faire, on reprend le contenu d'une ampoule par 50 cc. d'eau physiologique phéniquée. On fait une agglutination avec un sérum expérimental anti-brucellique titrant 1/3200, en utilisant la technique de Widal : taux de dilution du sérum : 1/20, 1/40, 1/80, etc., etc.

Ces points étant décrits, voici le détail des manœuvres de la lyophilisation de l'antigène brucellique.

1) On s'assure que le matériel déposé au fond de l'ampoule s'y étale régulièrement. En effet, le mélange culots-sérum est si épais qu'il faut parfois agiter un peu l'ampoule pour que l'étalement soit régulier et par conséquent la couche aussi mince que possible.

2) On pourvoit le condenseur de mélange réfrigérant.

3) On met en marche la pompe à palette d'abord, puis la pompe à diffusion.

4) On branche les ampoules sur une première rampe. On les congèle en les plongeant dans le mélange réfrigérant.

5) On ouvre le robinet-bloc correspondant à la rampe chargée.

6) On essuie rapidement les ampoules, puis on vérifie le vide dans chaque ampoule par l'appareil à haute fréquence.

7) On observe qu'une nouvelle pellicule de glace se forme à l'extérieur des ampoules.

8) On met en marche la rampe suivante en procédant de la même façon, et ainsi de suite.

9) On observe un réchauffement total des ampoules dont le matériel est complètement desséché.

10) On ferme le robinet-bloc de la première rampe prête.

11) On enlève les ampoules de l'appareil.

12) On étire les cols des ampoules de façon à ce qu'il reste encore un canal perméable.

13) On remet les ampoules sur l'appareil.

14) On rétablit le vide.

15) On scelle sous vide.

16) On contrôle le vide après scellage dans chaque ampoule au moyen de l'appareil à haute fréquence.

CONTROLE DE L'ANTIGENE

Après la lyophilisation, on procède à une nouvelle standardisation de l'antigène.

On opère comme si on allait reconstituer un antigène pour son emploi normal.

La description de ces manipulations peut paraître fastidieuse, mais quelques chercheurs nous ont dit qu'ils s'étaient achoppés à de petits détails, notamment à l'ouverture des ampoules. Nous croyons donc utile de donner ces précisions.

1) On prépare un petit ballon contenant 50 cc. d'eau physiologique phéniquée à 5 pour mille. On se munit d'une pipette non graduée stérile, une pipette Pasteur par exemple.

2) On fait un trait de scie sur l'ampoule.

3) On chauffe un fragment de verre, on l'applique sur le trait de scie, une fente court alors autour du col de l'ampoule qui est prête à être ouverte par une légère pression du doigt.

4) On prélève quelques cc. du ballon d'eau physiologique, on les place dans l'ampoule dont le contenu doit s'émulsionner facilement par quelques mouvements d'aspiration de la pipette.

5) On reprend cette émulsion et on la verse dans le ballon.

On obtient ainsi directement l'antigène prêt à l'emploi à la dilution standard.

On fait une agglutination avec un sérum expérimental anti-brucellique titrant 1/3200, en utilisant la technique de Widal: taux de dilution du sérum : 1/20, 1/40, 1/80, etc., etc.

Si cette agglutination a donné un résultat valable, on procède alors à la titration de l'antigène, selon la technique de Weybridge mentionnée plus haut. Les taux obtenus doivent être les mêmes qu'avant lyophilisation pour que l'antigène soit valable. Le contact avec un sérum négatif ne doit pas agglutiner l'antigène.

Les ampoules ainsi contrôlées et déclarées valables sont étiquetées et stockées à la température du laboratoire, sans précautions spéciales.

Stabilité de l'antigène.

Nous avons soumis cet antigène à l'épreuve du chaud, du froid, et du temps.

1) **Résistance à la chaleur :** Des ampoules ont été stockées à 37° pendant deux ans. Tous les deux mois une ampoule a été prélevée du lot. On n'a pas pu observer de diminution de l'agglutinabilité dans ce lot. Des ampoules ont été stockées au bain-marie à 50° pendant 6 mois. On a prélevé une ampoule chaque semaine. Ni l'agglutinabilité, ni l'homogénéité n'ont changé.

On a placé les ampoules pendant 10 minutes à 100°. Le produit ne s'est plus mis facilement en suspension. Pour éliminer les flocons observés dans le corps du liquide, nous avons filtré sur coton et procédé à une agglutination type Widal avec un sérum positif, d'une part, et un sérum négatif d'autre part. Les résultats obtenus ont été valables. Cette épreuve de stabilité à 100° est une épreuve de laboratoire, qui dépasse le cadre des possibilités courantes d'atteinte des produits biologiques. Nous voulions simplement nous rendre compte jusqu'où pouvaient aller les possibilités de conservation de l'agglutinabilité.

2) **Résistance au froid :** Des lots d'ampoules ont été placés au frigorifique à $+4^{\circ}$ et à -20° , pendant 1 an. Le contenu des ampoules était en parfait état de conservation.

Des ampoules ont été placées alternativement au frigorifique à $+4^{\circ}$, puis à l'étuve à 37°, 5 fois de suite et titrées après ces changements de température. Il n'a pas été observé de changement dans l'état de ces produits.

3) **Epreuve du temps.** — Des ampoules ont été conservées depuis 4 ans à la température du laboratoire sans précaution spéciale. Cet antigène est encore aussi valable qu'au moment de la lyophilisation.

4) **Résistance aux radiations solaires.** — Nous nous sommes demandé s'il était nécessaire de conserver les ampoules à l'obscurité, le verre des ampoules n'étant pas coloré. Nous avons placé six ampoules sur une table dans un local à insolation normale pendant 2 mois d'été. Le soleil irradiait ces ampoules environ 4 heures par jour. L'antigène n'a pas subi de modification après cette épreuve.

Nous n'avons pas jugé utile de soumettre ces ampoules à l'épreuve d'autres facteurs physiques : radiations ultra-violettes, infra-rouges, ou autre, ayant désiré nous rapprocher le plus possible de la pratique courante.

En conclusion, l'antigène lyophilisé résiste à la chaleur et au temps dans les conditions normales d'utilisation.

Il est à remarquer qu'un antigène lyophilisé, quel que soit son temps de conservation à l'état lyophile et quelle que soit la température à laquelle il ait été conservé, peut être reconstitué

et employé alors aussi longtemps qu'une émulsion fraîchement préparée.

Par exemple, un antigène lyophilisé le 15 mai 1951 et mis en suspension le 15 juillet 1955 pourra être utilisé aussi longtemps à l'état liquide qu'un antigène frais fabriqué le 15 juillet 1955.

Il ressort des expériences précédentes que cet antigène est stable et peut être conservé facilement.

Il va sans dire que, sous cette forme, il n'est pas destiné à de grands laboratoires qui ont la possibilité de fabriquer eux-mêmes leur antigène et surtout la possibilité de le titrer à l'aide du sérum standard, selon les prescriptions de l'OMS. Ces laboratoires ont un débit trop grand pour justifier la lyophilisation de l'antigène.

Cette forme de présentation de l'antigène brucellique est surtout destinée à de petits laboratoires. Aussi, est-elle utile au maximum dans des pays où la centralisation n'est pas encore poussée.

Elle permet alors d'avoir des résultats comparables d'un laboratoire à l'autre dans un même pays ou d'un pays à l'autre, quelle que soit l'importance du laboratoire.

Néanmoins, de grands laboratoires ont bien voulu contrôler et utiliser l'antigène lyophilisé provenant de Lausanne. Nous les remercions des résultats qu'ils ont bien voulu nous communiquer et que nous résumons très brièvement ci-après :

Institut sérothérapique d'Etat (Copenhague).

Une cinquantaine d'agglutinations ont été pratiquées en double avec l'antigène danois frais et notre antigène lyophilisé. Nous extrayons du rapport et des tableaux de Christensen les conclusions suivantes : « Aucune différence ni dans le titre ni dans l'intensité de l'agglutination, la rapidité de son apparition, ni dans la tendance à inhibition par des concentrations fortes de sérum n'ont pu être constatées ». « Il y a cependant une différence qui n'est pas exprimée dans les tableaux : votre antigène donne partout une agglutination granuleuse très belle, tandis que notre antigène s'agglutine souvent d'une manière plus muqueuse. »

De plus, nous avons lyophilisé l'antigène que l'Institut Sérothérapique nous avait envoyé et que nous lui avons retourné, en suite de quoi il nous a fait part de ses résultats, dont voici la conclusion : « la suspension de notre antigène lyophilisé s'agglutine plus lentement que la suspension originale (lecture de deux

en deux heures, mais les différentes suspensions donnent à peu près le même résultat final.»

Laboratoire vétérinaire du Ministère de l'Agriculture et des Pêcheries à Weybridge (Grande-Bretagne).

Nous avons tout d'abord lyophilisé l'antigène que nous a envoyé le Dr Stableforth qui conclut à leur sujet : « Mon impression générale en ce qui concerne l'antigène lyophilisé est la suivante : cet antigène donne des résultats satisfaisants, mais ces résultats sont peut-être un peu plus variables que ceux obtenus avec le matériel liquide. L'emploi de l'antigène lyophilisé aurait certainement de grands avantages si nous pouvions être sûrs de reconstituer un antigène exactement semblable. »

Puis le Dr Stableforth nous a envoyé la souche 99 de son laboratoire et nous avons fabriqué l'antigène selon les prescriptions de l'OMS tel que nous l'avons exposé dans les pages qui précèdent.

S'attachant à la possibilité de conserver l'antigène, le Dr Stableforth a décidé de garder un lot d'ampoules dans son laboratoire en ouvrant une chaque année, pendant 10 ans. Les résultats des 4 premières années sont satisfaisants : aucune différence n'est apparue entre les premiers et les derniers résultats (communication orale). L'expérience se poursuit.

En France. 30 laboratoires départementaux ont reçu de l'antigène lyophilisé. Une circulaire ministérielle leur en avait proposé l'expérimentation. Parmi les réponses que nous avons reçues nous citerons :

Le Centre de recherches sur la fièvre ondulante (Montpellier).

« Les sérums positifs humains et animaux (bovins, caprins, cobayes) sont agglutinés aux mêmes taux, les sérums négatifs humains et animaux sont aussi strictement négatifs. Donc égalité de sensibilité et de spécificité ». (Dr Carrère).

Le Service des Epizooties du Laboratoire départemental du Gard (Nîmes).

Ce laboratoire a pratiqué quelques agglutinations en double avec des résultats identiques. « Les agglutinations données par votre antigène lyophilisé étaient plus nettes, plus granulées : véritable agglutination macroscopique dans une émulsion plus dépouillée (Dr vét. Doutre).

Service vétérinaire de Nîmes :

« Nous avons eu l'occasion de faire des essais assez nombreux sur le sang de moutons, de chèvres et de bovins, avec votre antigène. Les résultats sont très satisfaisants et toujours concordant avec ceux des autres antigènes ; au point de vue techni-

que, on y trouve même un avantage appréciable, c'est leur lisibilité très nette.» (Le Directeur).

Le Laboratoire d'Analyses médicales Roger-Cazala à Chateauroux (Indre) a eu l'amabilité de nous envoyer immédiatement quelques résultats qui concordent tous avec ceux obtenus par l'antigène de Montpellier, dont il se sert habituellement.

Les laboratoires français qui ont expérimentés notre antigène l'ont comparé avec celui qu'ils emploient habituellement; c'est, soit l'antigène de CRFO à Montpellier, soit celui de l'Institut Pasteur de Paris.

Avec les laboratoires danois, anglais et français qui utilisent chacun leur antigène pour ainsi dire national, nous devons parler encore du Centre Italien pour les Brucelloses à Florence (Dr Gargani) qui lui aussi a comparé notre antigène à un antigène local en obtenant, d'après les premières réponses reçues, des résultats sensiblement identiques.

Les laboratoires turcs, centralisés par l'Institut Central d'Hygiène Refik Saydam (Dr S. Bilal Golem) et le Centre OMS des Brucelloses de l'Institut Vétérinaire de Bactériologie d'Etlik (Dr Durusan) à Ankara, se rattachent au groupe anglais, car ils utilisent la souche 99 de Weybridge. Les quelques résultats préliminaires qu'ils ont eu l'amabilité de nous faire parvenir sont satisfaisants.

Un autre antigène très utilisé est celui du Bureau of Animal Industries de Beltsville (U.S.A.). Il est fabriqué avec la souche 1119-3 de leur Laboratoire. Nous avons reçu cet antigène et l'avons lyophilisé, puis renvoyé au laboratoire d'origine pour comparaison.

D'autres part, nous avons reçu des lettres de quelques chercheurs d'outre Atlantique, qui s'intéressent à la lyophilisation de l'antigène et qui nous ont demandé quelques ampoules de notre antigène lyophilisé. Ceux qui nous ont communiqué leurs résultats sont :

Le Dr Abrams, bactériologue du Département d'Immunologie de la Army Medical Service Graduate School à Washington, qui s'est montré satisfait.

Le Dr W.L. Loving, directeur du Bureau of Laboratories du Health Dept. of Milwaukee, qui a fait les essais comparatifs après 10 mois de stockage à la température du laboratoire, et n'a pas constaté de différence entre les deux antigènes.

Le Dr Felix Ramacciotti de Cordoba (Argentine) qui a effectué les essais par la méthode rapide des gouttes a également eu des résultats comparables et satisfaisants.

Nous nous devons de signaler enfin qu'une expérience faite sur une plus large échelle a été permise grâce au Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique, qui a attribué au Prof. Hauduroy des subsides pour effectuer une statistique plus étendue que ce qui pouvait être fait dans le cadre du travail courant de l'Institut d'Hygiène.

Des agglutinations sont pratiquées en double avec de l'antigène frais provenant de l'Institut Vétérinaire Galli-Valerio à Lausanne d'une part, et de l'antigène lyophilisé fabriqué par nos soins avec la souche 99 de Weybridge, d'autre part.

Les agglutinations elles-mêmes sont faites minutieusement à l'Institut d'hygiène par M^{me} G. Grobet et M^{lle} E. Hauduroy, que nous tenons à remercier ici bien sincèrement.

L'expérience porte sur quelques milliers de sérums positifs et négatifs humains et bovins. Elle est en cours et fera l'objet d'une communication ultérieure.

Nous nous permettons pourtant de tirer quelques conclusions de ce travail (sans calcul statistique qui sera effectué une fois le travail terminé). Il y a environ 70 % des réponses (positives et négatives) qui sont identiques, 28 % qui accusent une différence de 2 tubes (ceci peut être dû aux manipulations et n'est — à notre avis pas significatif), et 2 % qui accusent une différence de 3 tubes, ce qui nous semble une différence réelle. C'est toujours l'antigène lyophilisé qui donne les réponses positives dans les dilutions plus élevées. On peut donc le considérer comme plus sensible.

Il est à noter qu'aucun sérum n'a été positif avec un antigène et négatif avec l'autre.

Les résultats obtenus à l'Institut d'Hygiène semblent donc confirmer ceux qui ont été obtenus par les autres chercheurs, et l'on peut conclure que l'antigène lyophilisé donne des résultats valables, en tous cas en ce qui concerne la pratique courante, du moins en médecine humaine.

En ce qui concerne la pratique vétérinaire, le problème est un peu différent. On estime généralement qu'une bête qui a une agglutination positive jusqu'à 1/40 est encore vendable sur le marché international et même sur les marchés des pays qui luttent officiellement contre la brucellose. Si le sérum de l'animal agglutine encore l'antigène au taux de 1/80 d'une manière nette, on estime en Suisse et dans d'autres pays européens, que cet animal n'est plus acceptable sur le marché.

On comprendra dès lors que l'excès de sensibilité de l'antigène serait une grave entrave pour le marchand de bétail ou l'agriculteur qui, soucieux de lutter contre la brucellose, avaient fait vacciner leur bétail avec le vaccin Buck, ou pour ceux dont

toute l'écurie présente des taux d'agglutination constamment bas.

Dans ce cas un antigène qui serait très sensible semblerait presque inacceptable pour l'économie du pays. En effet, même si dans un pays déterminé, on peut décider que l'on admet un taux plus élevé d'agglutination sans sanction si l'on s'est servi d'un antigène standardisé spécialement sensible, ce résultat ne serait dès lors pas valable pour le marché international.

Suivant les conseils de M. le Dr Bouvier, directeur de l'Institut Vétérinaire Galli-Valerio à Lausanne, que nous tenons à remercier ici bien sincèrement, nous avons reconsidéré le problème sous cet angle et compté quelle aurait été la différence des pourcentages des animaux mis hors commerce en tenant compte de l'agglutination faite avec l'antigène lyophilisé.

Nous sommes arrivés au chiffre assez élevé à notre avis de 2 % (sur plus de 3000 agglutinations). Il est remarquable que cet antigène lyophilisé, standardisé à l'aide du sérum étalon se montre ainsi plus sensible que le même antigène non lyophilisé.

Cette restriction à l'emploi de l'antigène lyophilisé n'est du reste que momentanée. En effet, il est de plus en plus admis qu'un sérum réellement négatif n'agglutine un antigène spécifique à aucun taux. Donc, idéalement, on peut penser que lorsqu'on aura extirpé la brucellose animale d'un pays grâce à des lois sanitaires adéquates un antigène sensible sera le bienvenu pour empêcher l'entrée d'animaux positifs, le fussent-ils seulement à 1 sur 20 ou 1 sur 40.

En effet, il est à remarquer que les sérums absolument négatifs le sont sans aucune exception, avec les deux antigènes. On peut donc bien affirmer dès lors que lorsque l'on admet qu'un sérum positif au taux d'agglutination à $1/20$ ou $1/40$ peut être considéré comme négatif, ce n'est qu'une tolérance pratique pour les usages courants, mais qu'il s'agit bien là tout de même de la présence réelle d'agglutinines anti-Bang.

La petite restriction que nous avons cru devoir formuler ici est donc de peu d'importance pratique d'une part et n'entame en rien la valeur absolue de cette étude théorique de l'antigène brucellique lyophilisé d'autre part.

Laissant le côté strictement pratique, nous avons désiré comparer statistiquement les résultats de l'expérience que nous avons mentionnée plus haut (3000 agglutinations pratiquées en double avec un antigène frais et le même antigène lyophilisé).

Les calculs statistiques ont été effectués par le Professeur Ch. Blanc, que nous remercions ici bien sincèrement.

Pour effectuer ces calculs, le Prof. Blanc nous a priés de considérer des paires de mesures, c'est-à-dire de noter pour

chaque dilution de chaque agglutination si le résultat était égal, supérieur ou inférieur avec un antigène ou avec l'autre.

Nous nous permettons de reproduire directement les conclusions du Prof. Blanc, dont la rigueur du texte ne saurait être remplacée par un autre.

Les observations considérées avaient pour but la comparaison de deux procédés désignés ici par B et H. Ces observations ont été faites en grand nombre, à diverses concentrations ; dans chaque cas, et pour chaque procédé, l'intensité d'une réaction était notée par un signe, allant de 0 (absence de réaction) à +++ (réaction maximum).

Dans un tel cas, il convient de considérer non pas les mesures individuelles, mais les **paires de mesures** (données par les deux procédés); cela étant fait, on a réparti ces paires en 5 classes :

1. Cas où $B = 0$ et $H = 0$;
2. Cas où $B = +++$ et $H = +++$;
3. Cas où B est inférieur à H ;
4. Cas où B est égal à H (autres que les cas 1 et 2) ;
5. Cas où B est supérieur à H.

Les résultats des classes 1 et 2 ne doivent pas entrer en ligne de compte pour la comparaison statistique des deux procédés : il paraît en effet raisonnable de ne pas prendre en considération des observations qui se situent systématiquement en dehors de ce que l'on pourrait appeler la zone d'appréciation.

Ayant donc laissé de côté (pour chaque concentration) les observations qui se situent dans les classes 1 et 2, on a calculé en % pour les autres classes leur fréquence relativement à l'ensemble des résultats retenus ; mais on sait qu'il est toujours insuffisant de baser des conclusions statistiques sur un pourcentage, en l'absence de toute considération de dispersion possible : Pour tester rigoureusement les résultats, on a alors calculé non seulement ces pourcentages, mais aussi leurs **limites de confiance à 99 %**.

(La notion précise de limites de confiance demanderait, pour être définie exactement, des développements en fait inutiles ici ; pratiquement, ce sont les limites entre lesquelles l'expérimentateur peut admettre que se trouve presque certainement le pourcentage « vrai » qu'il a cherché à estimer par ses observations ; limites à 99 % signifie qu'il a à la longue une chance sur cent de se tromper en admettant que le pourcentage se trouve entre ces limites. On trouvera des tables pour le calcul des limites de confiance dans l'ouvrage, que nous avons utilisé : **Biometrika Tables for Statisticians**, I, Cambridge Univ. Press. 1954, p. 205).

Les limites de confiances sont données, en %, dans le tableau ci-joint, pour chaque concentration. Elles présentent, d'une concentration à l'autre, une régularité très remarquable. On voit ainsi que le pourcentage des cas où H est supérieur à B est toujours dans des limites situées vers 70 à 75 %, alors que H est inférieur dans environ 5 % des cas.

Toute réduction d'un grand nombre de résultats statistiques dans quelques pourcentages et limites de confiance implique inévitablement une perte d'information ; la méthode adoptée ici réduit cette perte au minimum ; les nombres figurant sur le tableau résument très bien l'ensemble des observations faites.

Tableau
Dénombrement des observations, effectif des classes.

Conc. :	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
Classe 1	496	127	442	889	1551	1965	2200
2	788	476	332	231	154	113	70
3	1357	1422	1354	1210	802	474	293
4	580	509	462	312	206	100	92
5	20	29	35	33	29	32	30
Pourcentage des cas où H est supérieur	69	73	73	78	77	78	71 %
Limites de conf.	67 72	70 75	70 75	75 80	73 81	73 82	65 % 76 %
Pourcentage des cas où H = B	30	26	25	20	20	16	22 %
Limites de conf.	27 33	23 29	22 28	17 23	17 23	13 21	17 % 28 %
Pourcentage des cas où H est inférieur	1	1	2	2	3	5	8 %
Limites de conf.	0 2	0 2	0 3	0 3	0 4	0 8	0 % 11 %

Il ressort de ces chiffres que le pourcentage est remarquablement constant. Par exemple, le pourcentage des cas où il est supérieur à B est toujours dans des limites situées entre 70 et 75 %.

Ces chiffres parlent d'eux-mêmes et nous nous abstenons de commentaires à leur sujet.

LES ANTIGÈNES SALMONELLIQUES

Si la standardisation de l'antigène brucellique est particulièrement désirée par les organismes internationaux, celle des autres antigènes bactériens ne manque pas d'intérêt.

Nous avons voulu essayer de montrer que la lyophilisation est une méthode de stabilisation des antigènes bactériens, qui ne s'applique pas seulement à l'antigène brucellique, mais qui peut être étendue à n'importe quel antigène.

Dans ce but, nous avons essayé de lyophiliser des antigènes salmonelliques.

Le problème de la standardisation des antigènes salmonelliques.

Tous les auteurs s'accordent à penser que la valeur du séro-diagnostic de Widal est variable. Elle dépend de la technique employée et surtout de l'agglutinabilité de l'antigène.

En 1935, Kauffmann préconisait une standardisation de la méthode d'agglutination par : l'utilisation de mêmes souches, l'entretien des souches sur de mêmes milieux, la préparation des émulsions selon une formule unique, les réactions effectuées par des antigènes O et H séparément, l'utilisation d'émulsions tuées et stables.

En 1937, un Comité d'experts s'est réuni à Londres au « Medical Research Council », sous l'égide de la Société des Nations, dans le but d'étudier la standardisation des méthodes d'agglutination des microbes du groupe Salmonelle. Ce Comité a fait certaines recommandations que nous résumons brièvement :

- 1) Création d'un Centre International pour l'identification des souches de Salmonella,
- 2) Standardisation des techniques d'agglutination et de lecture de la réaction de Widal (Routine Widal-Reaction).
- 3) Emploi d'émulsions séparées pour la recherche des agglutinines O et H,
- 4) Standardisation de la préparation de ces émulsions et recherche du « Titre standard » à l'aide d'un sérum-étalon.

Ces quelques notes historiques montrent que la standardisation des antigènes salmonelliques pose aussi un problème qui.

s'il n'est pas aussi urgent du point de vue international, reste important dans le cadre du laboratoire.

Technique de fabrication des antigènes

La technique de fabrication est la même pour toutes les salmonelles.

Souches : On choisit des souches dont le facteur antigénique XII est faible, et dont l'antigénicité des facteurs spécifiques est très développée. On conserve ces souches à l'état lyophile.

Voici les souches dont nous nous sommes servis ; elles proviennent toutes du Centre de Collection de types microbiens de l'Institut d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lausanne :

- | | |
|---------------------------|---|
| Eberthella typhosa N° 291 | origine : Service des Analyses de l'Institut d'Hygiène de Lausanne, conservée depuis avril 1946 ; |
| N° 293 | origine : Institut d'Hygiène de l'Université de Zurich, conservée depuis août 1946 ; |
| Salmonella para-A. N° 302 | origine : Institut Sérothérapique de Berne, conservée depuis le 28. 11. 46 ; |
| N° 344 | origine : Service des Analyses de l'Institut d'Hygiène de Lausanne, conservée depuis le 3. 10. 46 ; |
| Salmonella para-B. N° 298 | origine : Institut Sérothérapique de Berne, conservée depuis le 28. 11. 46 ; |
| N° 321 | origine : Service des Analyses de l'Institut d'Hygiène de Lausanne, conservée depuis le 21. 2. 42 ; |
| Salmonella para-C. N° 301 | origine : Institut Sérothérapique de Berne, conservée depuis le 28. 11. 46. |

Ces souches sont conservées au Centre de Collection de types microbiens de Lausanne, à l'état lyophile. Les dates indiquées sont les dates d'entrée en collection à Lausanne.

Préparation des émulsions :

A) Emulsions destinées à révéler l'agglutination H.

Une colonie isolée cultivée sur gélose inclinée à partir d'une souche lyophilisée est ensemencée dans un ballon contenant

environ 200 cc. de bouillon ordinaire. Après 8 heures de séjour à l'étuve à 37°, on ajoute du formol du commerce, de façon à obtenir une concentration finale de 2 pour mille. On replace le ballon à l'étuve pendant 24 heures. On centrifuge cette culture et on reprend le culot bactérien par très peu d'eau physiologique. On obtient ainsi une émulsion très concentrée qui est prête à être lyophilisée après adjonction du protecteur convenable (dont nous parlerons par la suite).

B) Emulsions destinées à révéler l'agglutination.

On ensemence sur gélose inclinée une culture lyophilisée. On repique cette culture après 24 heures de séjour à 37° sur un nombre convenable de tubes de gélose inclinée. On émulsionne les cultures obtenues, après un nouveau séjour de 24 heures à l'étuve à 37°, chaque tube dans 2 cc. d'eau physiologique additionnée de 2 cc. d'alcool à 96°. On garde cette émulsion pendant 24 heures à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière en agitant fréquemment. On centrifuge l'émulsion à 6000 t m. pendant 20 minutes, puis on lave trois fois à l'eau physiologique. On reprend le culot de la troisième centrifugation par très peu d'eau physiologique. Cette émulsion concentrée est prête à être lyophilisée après adjonction du protecteur convenable.

C) Emulsions destinées à révéler l'agglutination complète OIL.

Les émulsions OH phéniquées employées généralement comme émulsion complète ne nous ayant pas donné de bons résultats après lyophilisation (auto-agglutination), nous avons été obligés pour obtenir des émulsions complètes de mélanger une partie d'émulsion H avec une partie d'émulsion O, avant l'adjonction du protecteur.

Lyophilisation des émulsions.

a) Titration.

On prélève 1 cc. de l'émulsion concentrée que l'on dilue de façon à obtenir environ 400,000,000 de germes par cc. On vérifie l'opacité au photo-mètre de Meunier. On retient le titre de dilution de l'émulsion concentrée afin de pouvoir calculer combien d'émulsion il faut distribuer dans chaque ampoule au moment de la lyophilisation. On titre l'émulsion de 400,000,000 de germes par cc. en effectuant des agglutinations

- 1) vis à vis d'un sérum expérimental à titre connu devant agglutiner la souche choisie,
- 2) vis à vis d'un sérum expérimental d'une salmonella d'un autre groupe qui ne doit pas agglutiner la souche choisie.

b) Choix du protecteur.

Bien qu'il s'agisse d'émulsions tuées, il est indispensable d'ajouter un protecteur à l'émulsion concentrée pour protéger les agglutinines. Après avoir essayé divers hydrates de carbones et diverses albumines, telles que sérum d'animaux, lait, etc. qui n'ont pas donné de résultats réguliers, force nous fut d'employer comme protecteur un sérum bovin saturé par la souche. La saturation du sérum se fait en ajoutant des germes tués, en laissant en contact deux heures à l'étuve à 37°, en agitant fréquemment. On centrifuge ensuite le sérum à 6000 t m., pendant 20 minutes, puis on le stérilise en le filtrant à travers une bougie Chamberland 5 L III. On ajoute à l'émulsion concentrée environ une quantité égale de sérum saturé. On distribue ce mélange émulsion-sérum dans les ampoules de façon à obtenir après reconstitution une émulsion prête à l'emploi de 50 cc. On calcule aisément cette quantité d'après le chiffre de dilution obtenu au photomètre de Mounier. Cette quantité varie entre 0,1 et 0,25 cc.

La technique de lyophilisation et celle de reconstitution des antigènes salmonelliques sont exactement semblables à celles de l'antigène brucellique décrites en détail dans le chapitre précédent.

Les résultats obtenus sont satisfaisants. Nous avons conservé des émulsions pendant 5 ans sans observer le moindre changement dans l'agglutinabilité. Nous avons pratiqué des épreuves de résistance à la chaleur et aux autres agents physiques pareilles à celles que nous avons décrites pour l'antigène brucellique. Nous avons envoyé ces ampoules par poste ordinaire, sans précautions spéciales, et n'avons pas observé de changement dans la qualité de ces antigènes.

Nous n'avons pas jugé utile d'envoyer ces antigènes à titrer dans d'autres laboratoires, la vérification ayant été faite pour les antigènes brucelliques, ce qui nous a semblé suffisant.

En conclusion, les antigènes salmonelliques, soit en émulsions séparées, O et H, soit en émulsions complètes OH, peuvent être stabilisées, voir même standardisées, par lyophilisation. Les avantages sont les mêmes pour ces antigènes salmonelliques que pour l'antigène brucellique.

DISCUSSION

Quels sont les avantages et les inconvénients des antigènes lyophilisés ?

Il y a deux points différents à considérer :

- 1) un problème pratique : quel peut être l'apport de la nouvelle méthode à de petits laboratoires, qui pratiquent peu de séro-diagnostic ?
- 2) Un problème plus spéculatif : celui de la standardisation des antigènes bactériens.

Pour ce qui est du problème pratique, nous pensons que la forme même de la présentation de l'antigène est déjà un avantage. En effet, sans parler de la qualité de l'antigène, sa présentation sous forme lyophile permet l'envoi par poste ordinaire, sans précaution aucune, avec des emballages simples et un poids minime. Il va bien sans dire que n'importe quel laboratoire, si modeste soit-il, peut fournir l'eau physiologique nécessaire à la remise en suspension du produit. On peut donc envoyer les ampoules seules, contenant le produit sec, ce qui représente un poids très peu élevé en comparaison de celui du produit qu'il permet de reconstituer.

Le stockage des ampoules est simple : ni réfrigérateur, ni congélateur, ni même beaucoup de place ne sont exigés.

Ce qui est plus important encore, à notre avis, que ces premiers avantages, c'est le fait que ce produit, tant qu'il est conservé sous forme lyophile, a une validité pratiquement illimitée, quelles que soient les conditions dans lesquelles il est conservé.

Le bactériologue qui pratique un séro-diagnostic de Widal de temps en temps n'a pas le souci de savoir si son antigène est encore valable. Il a l'assurance d'avoir chez lui un produit qui ne perdra pas sa valeur au bout de peu de temps, qui n'est pas à remplacer à certaines dates. Il peut donc stocker une certaine quantité d'ampoules en sachant qu'il a à sa disposition, à n'importe quel moment, un produit dont la valeur ne varie pas, dont l'antigénicité est toujours stable. Il pourra donc comparer ces résultats actuels aux précédents, fussent-ils vieux de quelques mois.

Cet avantage pratique n'est pas à négliger quand on sait le souci et les frais que représentent le renouvellement et le

contrôle des produits biologiques périssables, surtout pour de petits laboratoires. Nous ne parlons pas du risque que courent certains travailleurs moins scrupuleux, en employant des produits biologiques périmés, dans l'interprétation de certains résultats d'analyse.

Il y a évidemment, toujours du point de vue pratique, quelques inconvénients à l'emploi des antigènes lyophilisés.

Pour reconstituer le produit, on doit faire quelques manipulations, qui sont évidemment un peu plus compliquées que le simple prélèvement dans un flacon tout prêt. Il faut mesurer l'eau physiologique, ouvrir l'ampoule, y verser une partie de l'eau physiologique pour mettre le produit en suspension, pipeter cette suspension et la verser dans la totalité de l'eau physiologique.

Ces manipulations, si simples soient-elles, doivent être exécutées soigneusement, si ce n'est pas stérilement. Il faut avoir à sa disposition une éprouvette ou une pipette graduées, de l'eau physiologique et un flacon.

Dans un petit laboratoire, cela peut paraître compliqué, surtout pour le premier essai.

De plus, le prix de revient d'un antigène lyophilisé est certainement plus élevé que celui d'un antigène frais.

Notre production d'antigène lyophilisé n'ayant rien de commercial, nous n'avons pas calculé à quel prix un laboratoire commercial de produits biologiques devrait vendre ces antigènes. Cependant, à première vue, nous pensons que leur prix serait plus élevé que celui des antigènes liquides.

Ce renchérissement serait peut-être compensé du reste par la diminution des frais d'emballage et de port et surtout par la suppression des frais de renouvellement des produits périmés.

Au reste, la question du prix de revient ne nous semble pas importante, car il serait juste que ces antigènes soient produits par de grands laboratoires centraux, placés sous l'égide d'organisations nationales ou internationales, par exemple, et qui auraient tout intérêt à ce que de petits laboratoires aient à leur disposition des produits biologiques aussi standardisés que possible. Ces centres devraient, de ce fait, délivrer ces produits de diagnostic à un prix aussi bas que possible, dans le but de progresser dans l'unification des méthodes de diagnostic des maladies infectieuses, tant humaines que vétérinaires.

Ces considérations nous amènent à discuter le second point du problème, qui est la standardisation des antigènes bactériens.

Comme nous l'avons exposé en détail dans les premiers chapitres de cette thèse, c'est le vœu de l'Office International des Epizooties que de standardiser le séro-diagnostic de Widal, au moins en ce qui concerne l'antigène brucellique.

Willems demande à standardiser non seulement les méthodes de dilution et les critères de lecture, mais aussi l'antigène lui-même. Il pense pour sa part que c'est le point le plus difficile. Il désirerait idéalement la diffusion d'un seul antigène à partir d'un laboratoire central, tout en sachant que ce vœu est irréalisable.

En effet, pourquoi vouloir imposer un antigène unique ? Là n'est pas, à notre avis, la bonne voie pour arriver à une standardisation. Comment donc pourrait-on demander à des travailleurs qui fabriquent depuis des années un antigène qu'ils connaissent et qui donne des résultats satisfaisants, de renoncer à cette fabrication pour acheter un produit provenant d'un autre laboratoire ?

Ce sacrifice fut-il consenti, il ne serait pas dit encore que la standardisation de l'agglutination soit absolue. Il faudrait encore être sûr d'avoir un produit stable sous n'importe quel climat, toutes autres conditions de l'expérience devant être rigoureusement semblables.

Bien plus, ce produit fut-il rigoureusement stable, il n'est pas encore certain que la standardisation idéale soit atteinte : en effet, il faudrait avoir à pratiquer des séro-diagnostic pour une seule espèce animale ; j'entends par là avoir à pratiquer des séro-diagnostic uniquement avec un sérum bovin, ou caprin, ou humain.

Renoux a, en effet, démontré que certains antigènes, connus pour leur irréprochable agglutinabilité lorsqu'il s'agit d'humain ou de bovin, se montrent en défaut lorsqu'il s'agit de sérum caprin.

Imposer un tel antigène risquerait de compromettre certains diagnostics, qui, au lieu d'être améliorés par la standardisation, seraient faussés et constitueraient alors un recul sérieux dans le dépistage des réservoirs d'infection brucellique.

Cet exemple montre à lui seul que l'espoir d'imposer un antigène unique est non seulement illusoire, mais sans fondement.

À la place d'un antigène unique, on pourrait envisager de standardiser quelques antigènes connus et produits par des laboratoires importants, qui ont chacun leurs raisons de garder le leur.

La titration de leur agglutinabilité suivie de la stabilisation de cette agglutinabilité semblerait déjà un progrès.

C'est pour fixer l'agglutinabilité des antigènes comparés entre eux et titrés que la lyophilisation pourra être proposée. Elle fournirait des produits stables conservant sous n'importe quel climat et sans limite de durée leur titre « standard » d'une part, et leurs qualités propres, d'autre part.

Lorsqu'on parle de titration, on arrive naturellement à l'idée d'étalon. L'antigène lyophilisé, tel qu'il a été expérimenté par nous, ne pourrait pas, à notre avis, servir d'étalon.

En effet, les quantités d'antigène à répartir dans chaque ampoule, étant minimes, il faudrait, pour que l'exactitude atteigne celle d'un étalon international, que la mise en ampoules soit pratiquée avec des instruments plus précis que la seringue à injection intra-dermique que nous avons utilisée. Nous n'avons pas cherché à perfectionner ce point. Nous voulions obtenir un produit simple pour la pratique courante et non pas un étalon.

Cet étalon n'est, du reste, pas nécessaire pour titrer des antigènes. Il existe, en effet, un sérum standard, fourni par le laboratoire de Weybridge et recommandé par l'Office International des Epizooties. Ce sérum, conservé sous forme lyophile, est diffusé largement à tous les laboratoires qui en font la demande. Il constitue, à notre avis, un étalon dont l'emploi permet facilement la standardisation des antigènes brucelliques.

En ce qui concerne les antigènes salmonelliques, la standardisation est souhaitée, mais beaucoup plus difficile encore à réaliser. Notre objet ayant été de démontrer que l'on pouvait obtenir, par la lyophilisation, une stabilisation de divers antigènes bactériens nous n'avons pas poursuivi nos recherches dans le sens d'une standardisation des antigènes salmonelliques.

CONCLUSION

La lyophilisation s'applique aux antigènes bactériens. Elle conserve leur agglutinabilité et leur permet de résister aux épreuves de désagrégation qui altèrent les mêmes produits non lyophilisés.

Pour l'antigène brucellique, on doit appliquer une technique rigoureuse, en observant strictement les prescriptions de l'OMS. d'une part et les données de la technique de lyophilisation d'autre part.

Pour les antigènes salmonelliques, la lyophilisation des antigènes séparés O et H a seule été possible ; la lyophilisation des antigènes OH s'étant révélé entravée par la présence de phénol.

Cette technique apporte un certain nombre d'avantages pratiques, d'une part, et, d'autre part, elle permet de proposer une solution au problème de la standardisation des antigènes bactériens.

RÉSUMÉ

Dans le cadre des recherches de l'Institut d'hygiène de l'Université de Lausanne et du Professeur Hauduroy, en particulier, nous avons lyophilisé des antigènes bactériens, soit de l'antigène brucellique, préparé selon les prescriptions de l'OMS, soit des antigènes salmonelliques.

Nous avons vérifié ces antigènes par de très nombreuses agglutinations ; nous les avons fait vérifier aussi par d'autres laboratoires.

Ces expériences montrent que les antigènes bactériens lyophilisés sont stables, et donnent des résultats pareils à ceux du témoin non lyophilisé ou sont même parfois plus sensibles, tout en restant négatifs vis-à-vis de sérums négatifs.

Pour que les résultats soient satisfaisants, la technique de production doit être irréprochable.

Nous avons rappelé l'importance de la standardisation de l'antigène brucellique dans la prophylaxie des brucelloses, puis nous avons brièvement exposé le principe de la lyophilisation en général et du fonctionnement de l'appareil employé en particulier.

Nous avons examiné les différents avantages et inconvénients que la lyophilisation de ces antigènes pouvait présenter, et sommes arrivés à la conclusion qu'elle constituait une stabilisation de ces antigènes.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Anex Paul.** — Thèse de doctorat en médecine. Lausanne 1947.
2. **Hauduroy Paul.** — Presse Médicale 1950, **58**, 1397.
3. — Ann. Biol. Clin. 1951, **9**, 100.
4. **Hauduroy P. et Tanner F.** — C. R. A. S. 1952, 234. 2657.
5. — Rev. Immunol 1952, **16**, 320.
6. — Experientia. 1952. **8**, 466.
7. **Lerche et Roots.** — Tierartliche Umschau, 1948, 106.
8. **Lestradet.** — Encyclop. Méd. Mal. Inf. 8031a.
9. **Org. Mond. Santé.** FAO/WHO. — Brucellosis Information Series.
WHO/Bruc. 21 du 23 oct. 1950.
10. — FAO/WHO. — Brucellosis Information Series.
WHO/Bruc. 37 du 9 mars 1951.
11. — Sér. Rapp. techn. 1951, **37**, 21.
12. **Slink W. W. et all.** — J. Am. Med. Ass. 1949, **141**, 326.
13. — J. Am. Med. Ass. 1951, **145**, 1136.
14. **Stableforth.** — Office Int. des Epizooties. Rapp. à la XVIII^e session.
1950. R. n° 176.

